

가자미피 젤라틴 가수분해물로부터 항산화성 펩티드의 분리·정제 및 특성

김세권 · 이현철 · 변희국 · 전유진
부산수산대학교 화학과

Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Yellowfin Sole Skin Gelatin

Se-Kwon KIM, Hyun-Chel LEE, He-Guk BYUN and You-Jin JEON

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

To develop a natural antioxidative peptide, the gelatin was extracted from fish (Yellowfin sole) skin by hot water(50°C) extraction method and hydrolyzed with Alcalase, pronase and collagenase through a continuous 3-step membrane reactor. Each step enzymatic hydrolysates were determined the antioxidative activity and their synergistic effects, compared with α -tocopherol and butylated hydroxytoluene (BHT). Also, we tried to investigate the antioxidative disposition of peptide which was successfully separated by gel filtration, ion-exchange chromatography, and HPLC in cultured rat hepatocytes intoxicated with *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP).

Second step enzymatic hydrolysate (SSEH) among all hydrolysates and α -tocopherol was showed the strongest antioxidative activity. The optimum concentration of antioxidative activity for SSEH was 1% (w/w) in linoleic acid. The synergistic effects were increased in using the hydrolysate with tocopherol and BHT.

In the presence of the peptide isolated from SSEH, supplemented hepatocytes exposed to TBHP showed that delayed cell killing and decreased significantly the lipid peroxidation, compared with hepatocytes not cultured with isolated peptide.

Key words : antioxidative peptide, yellowfin sole skin gelatin, enzymatic hydrolysate

서 론

항산화제에 대한 연구는 1940년대 자동산화에 대한 연구가 이루어진 이래로 현재까지 꾸준히 이루어지고 있으며, 최근에는 유지나 지방산의 산화를 억제하기 위하여 많이 사용되고 있는 butylated hydroxyanisole (BHA)이나 butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG) 및 *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) 등의 합성항산화제가 항산화력이 강한 반면, 열안정성이 떨어지고, 유해물질을 생성하여 안정성의 측면에 문제가 있으므로 천연항산화제의 개발이 절실히 요구되어지고 있는 실정이다. 현재 알려져 있는

천연항산 화제로는 tocopherol (Aoyama, et al., 1985) 이 가장 항산화력이 높고 매우 실용적인 것으로 알려져 있다. 이 밖에 질소화합물 (Rhee et al., 1979; Hayes et al., 1977; Bishove and Henick, 1972)과 칩뿌리 (Oh, et al., 1990), 더덕 (Maeng and Park, 1991), 해바라기 (西橋, 1991), 쪽 (Lee et al., 1992)에 항산화성 성분이 존재하는 것으로 보고되고 있다. 이들 중 질소화합물인 펩티드는 그 구조나 생리작용면에서 상당히 주목을 받고 있다.

생리기능성 펩티드의 종류를 살펴보면, 동물성 유래의 호르몬류나 식물성 유래의 효소저해물질 등 활성형으로 존재하는 현재적(顯在的) 생리활성 펩티드,

소화과정이나 식품가공 과정에서 부분가수분해에 의해 불활성형 단백질로부터 파생되는 잠재적(潜在的) 생리활성 펩티드, cyclo (His-Pro) 등과 같은 가수분해 이외의 기구에 의해 생성되는 생리활성 펩티드 등이 있다.

최근 radioimmunoassay에 의해 분석감도가 향상됨에 따라 현재적 생리활성 peptide가 많이 알려지고 있으나 비교적 분자량이 크기 때문에 소화관에서 분해와 흡수에 의해 *in vivo*에서 어떠한 생리활성이 나타나는가는 아직 불명확한 것이 많다. 한편, 잠재적 생리활성 펩티드는 단백질 효소분해물로부터의 아편과 같은 제제(製劑)인 opioid 펩티드의 발견에 의해 개념이 확립되어진 새로운 종류의 펩티드이며, 새로운 생리활성 펩티드의 발견이 기대되어지는 분야이다. 이러한 잠재적 생리활성 펩티드는 주로 casein 유래의 것이 많고, 칼슘흡수 촉진작용이나 혈압강화작용, 혈청콜레스테롤 저하작용 및 산화방지작용 등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Yoshikawa, 1988). 따라서, 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소분해하여 얻어지는 저분자 펩티드로부터 생리활성의 검토가 이루어지고 있다. 대표적인 것으로 유(乳) 단백질 펩티드와 난(卵) 단백질 펩티드 및 어육(魚肉) 단백질 펩티드 (Suetsuna and Osajima, 1989), 대두(大頭) 단백질 펩티드 및 소맥(小麥) 단백질 펩티드(本井, 1989) 등이 알려져 있다.

천연항산화제의 연구방향도 종래의 식품으로의 응용가능성을 검토하는 것 뿐만 아니라, 노화나 발암의 원인이 되는 산소 라디칼이나 산화물 라디칼의 소거제로서의 역할과 생체내 지질과산화 반응의 억제 또는 라디칼의 관여에 의해 발생된다고 추정하는 변이원성(變異原性)과 암원성(癌原性)의 발현억제효과도 기대되어지고 있다 (大澤·並木, 1982).

본 연구에서는 이러한 취지로서 3단계 연속식 막반응기를 이용하여 추출한 어피젤라틴 가수분해물의 항산화제로서의 이용가능성을 검토하고자 분자량별로 분리한 펩티드의 linoleic acid에서의 항산화력을 시판 항산화제와 비교하였으며, 아울러 이들과의 상승작용도 검토하였다. 또한 여러단계의 분리과정을 거쳐 가장 항산화력이 뛰어난 펩티드만을 분리, 정제하여 이들의 간세포상에서의 과산화물 생성에 대한 방어작용에 미치는 영향도 검토하였다.

재료 및 방법

재 료

원료로 사용된 어피젤라틴은 가자미피로부터 열수추출로 제조한 가자미피 젤라틴을 사용하였고, 분해 효소인 alcalase, pronase 및 collagenase와 Sephadex G-25 (superfine), DEAE-Sephadex A-25, TBHP는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며, ODS 역상 컬럼은 Wako Pure Chemical Co.에서 구입하였다. 항산화성 측정시 사용된 유지인 linoleic acid (linoleic acid 55%, oleic acid 35%, 기타 10%)는 Fluka Chemie AG에서, 대조구인 일반항산화제로서 BHT (순도 99%)는 Ueno Co.에서, α -tocopherol (순도 95%)은 純正化學(株)에서 구입하였다. 또한, Donryu rat liver cell (Ac2F)는 일본 cell bank로부터 분주받아 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)는 Sigma Chemical Co.에서, fetal calf serum과 Antibiotics (S.M. 10 mg/ml, P.C. 10,000 U/ml)는 Gibco Co.(Grand island, U.S.A.) 제품을 구입하였다.

가수분해물의 제조

가수분해물은 전보(Kim et al., 1995)에서 보고된 방법에 따라 가자미피 젤라틴의 효소적 가수분해물을 각 단계별로 분자량 크기에 따라 제조하였다. 1단계 효소적 가수분해물 (First-Step Enzymatic Hydrolysate, FSEH)은 분자량 한계 범위 (molecular weight cut-off: MWCO)가 10kDa인 한외여과막을, 2단계 효소적 가수분해물 (Second-Step Enzymatic Hydrolysate, SSEH)은 MWCO가 5kDa인 한외여과막을, 그리고 3단계 효소적 가수분해물 (Third-Step Enzymatic Hydrolysate, TSEH)은 MWCO가 1kDa인 한외여과막을 각각 통과시켜 얻었다.

유지혼탁액 제조

유지혼탁액은 유지 10, 물 9, 유화제 1 (Tween-80: Span-80=1:1)의 비율로 혼합하여 균질기 (Ace Homogenizer AM-7)로 7분 동안 균질화시켜 유지혼탁액을 조제하였다.

과산화물 측정

과산화물가는 AOAC법 (1995)에 따라, 시료유 1g을

추출하여 유기농산액 (ubiquinone:aceticacid=2:3) 300 ml에 가하여, KKL300농도액 (1.5g/ml) 0.5ml를 가하여 약 1분간 강하게 진탕한 다음, 5분간 암습소에 방치하였다. 이 용액에 증류수 30ml를 가하여 1분간 진탕시키거나 1% 수용성 전분용액 5ml를 가하여 0.001NNa₂SO₃ 용액으로 적정하였다.

TBAA가 측정

TBAA는 Timmeretal(1955)의 방법을 채택하여, 시료 유 1.5g을 분쇄하여 증류수 99.5ml과 HCl (HCl:DD:VW=1:2) 2.5ml, sodiumiodide 22mg을 Kjel-dahl flask (250ml)에 넣고, 가열용액 560ml의 양을 추출하여 여과하였다. 여과액 55ml를 분쇄하고 TBAA 55 ml에 혼합하여 35분 동안 가열한 다음, 냉각시켜 531 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화 활성 평가 방법의 분별과 정정제

항산화 활성이 우수한 펩타이드를 분별하기 위해 gel filtration, ion-exchange chromatography 및 ODS 컬럼의 HPLC를 이용하여 분별한 후, 각 분획별 유출곡선 (분별을 100에 아인)의 일일 수를 측정하여 항산화 활성이 가장 뛰어난 펩타이드를 분별하였다. 먼저 추출한 여과액 1ml를 가열용액 30ml (2mg/ml)를 0.1 M NaCl을 포함하고 있는 560 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화시킨 Sphadex CG25 column (4.5×70cm)에 주입한 후, 동일 완충용액으로 용출 (유속: 100 ml/hr, 분배량: 100 ml)시켜 280 ml에서 흡광도를 측정하여 분별하고, 분별별로 동등할 경우 분별별 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 활성이 높은 분획을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)로 평형화시킨 DEAESphadex AA25 column (2×60 cm)에 주입하고, 동일 완충용액 1로 비분별 분획을 용출시킨 후, 완충용액 700 ml과 1.0 M NaCl이 포함된 700 ml 용액 700 ml을 사용하여 선형상 농도구분법으로 분별을 (유속: 300 ml/hr, 분배량: 7 ml)하여 얻어진 분획을 투구막 (MWCO 1,000)을 사용하여 증류수에 대해 투구막시킨 후, 동등할 경우 하였고, 분별별 항산화 활성을 측정 후, 가장 항산화 활성이 뛰어난 분획을 ODS 역상 컬럼에 살하여 있는 HPLC (Spectra Physics C6) 상에서 용액 1ml를 단일 펩타이드를 정제하였다. 이때, 용출 속도는 0.5 ml/min, 이동상으로 0.1% trif-

luoroacetic acid를 함유한 acetonitrile/water를 사용하여 230 nm에서 흡광도를 측정하였다.

새로운 배양

장상간세포 AA2F를 fetal calf serum을 9% 함유하는 DMEM 배양로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 즉, 25-cm² plastic flask에 DMEM 3 ml과 1.33×10⁶ cells/flask의 비율로 세포를 넣고, 각각 1360 μg/ml 7.5% NH₄CO₃과 58.4 μg/ml glutamine, 4.44 μg/ml antibiotics, 9% heat-inactivated (55°C, 15 min) fetal calf serum (FCS)을 첨가하여 2시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 또한 22일에 한 번 subculture하여 세포 주기를 유지하였다.

새로운 측정

새로운 측정 실험은 18-20 hr 배양시킨 세포에 1 μM의 농도로 분별한 항산화 활성 평가의 첨가제와 함께 가두기를 만들고 18-20 hr 배양한 후, COMBES calcium magnesium fire phosphate buffer solution으로 세척하고, BCS가 포함된 1%의 양은 배양상에서 750 μM TBRR (t-butylhydroperoxide)를 90분 동안 처리한 후, cell counting과 lipid peroxidation을 측정하였다.

새로운 분별

새로운 coefficient에 대한 plastic flask에 배양상 등 약물을 제거하고 COMBES로 세척한 후, 배양로 세포를 분별시키고, 그 새로운 용액을 90% 이하에서 trypan blue와 1:11 비율로 혼합한 후, 광학현미경 상에서 Hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

Lipid peroxidation 측정

Lipid peroxidation은 Okawa et al. (1979)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 각 세포 2 ml를 sonicate 시킨 다음, 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액 4 ml를 첨가하여 ice bath에서 10분 동안 방치하고, 원상분리 (900 rpm, 5분) 하였다. TCA 처리한 상층액 0.1 ml과 0.2 ml 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액, 1.5 ml acetic acid (pH 4.3), 1.5 ml 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 혼합한 후, 밀도로 최후 4.0 ml로 및 측정하였다. 이 용액을 95°C에서 60분 동안 가열시키고,

상온에서 냉각한 다음, 물 1 ml와 유기용매 (n-butanol: pyridine=15: 1 (v/v)) 5 ml를 첨가하여 강하게 진탕 시킨 후, 원심분리 (4,000rpm, 10분)하여 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 기준물질로서 tetramethoxypropane을 사용하였고, 단백질 함량은 Lowry법에 따라 결정하였다.

결과 및 고찰

어피젤라틴 가수분해물의 항산화성 및 항산화제의 상승효과

연속식 3단계 막반응기에서 효소적으로 분해한 각 단계별 어피젤라틴 가수분해물의 항산화성을 60 ± 1 °C로 조절된 항온기내에서 10일간 자동산화시킨 후 측정된 결과, 가수분해물을 첨가시키지 않은 유지의 변패도에 비해 각각 25~60%, 10~35%의 항산화능의 증가를 나타내었다. 그 중 2단계 가수분해물의 항산화력이 linoleic acid에서는 60%로 가장 높았으며, α-tocopherol과의 비교에서도 약 10% 정도 높은 항산화력을 나타냄으로써 범용되고 있는 천연 항산화제인 α-tocopherol보다 우수한 항산화제임이 판명되었다. 그러나 1단계 가수분해물이나 3단계 가수분해물은 10~25%의 항산화력을 나타내었으며, 이것은 α-tocopherol에 비해 10~15% 정도 낮았고, 펩티드의 원료로 사용된 어피젤라틴 자체의 항산화력은 거의 나타나지 않았다 (Fig. 1, 2). 일반적으로 아미노산, 펩티드 및 단백질 간의 항산화력 비교에서 펩티드가 가장 우수한 것으로 알려져 있으며, Ala를 N말단으로 하는 9종류의 dipeptide의 항산화성을 조사한 결과, Met, Trp, His, Tyr을 다량 함유한 펩티드일 수록 항산화력이 우수하였다. 그러나 유지에 대해서는 용해성이 우수한 Val, Leu, Ile등의 분지측쇄를 가진 아미노산을 구성성분으로 이루어진 펩티드가 항산화력이 높은 것으로 보고되었다 (山口, 1989). Yamaguchi et al.(1979)은 대두단백질을 각종 효소로 가수분해하였을 때, 가수분해율이 6~9%의 펩티드에서 높은 항산화력을 나타내었다고 보고하였다. Kohen et al.(1988)은 채소골격 근육조직에서 발견되는 dipeptide인 anserine (β-alanyl-L-1-methylhistidine)과 carnosine (β-alanyl-methylhistidine)이 항산화력이 우수하다고 보고한 바 있다.

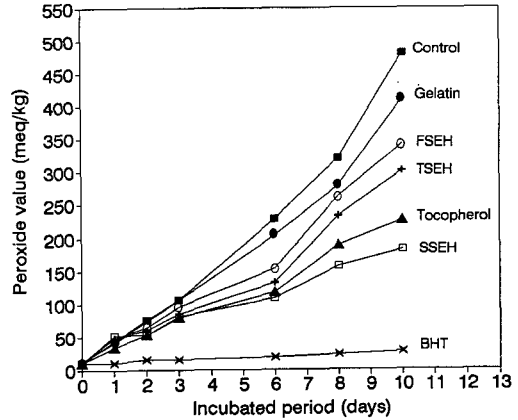


Fig. 1. Comparison of peroxide value* of gelatin hydrolysates with commercial antioxidants in the linoleic acid.

Control: no antioxidant
 BHT: butylated hydroxytoluene
 FSEH: First-Step Enzymatic Hydrolysate
 SSEH: Second-Step Enzymatic Hydrolysate
 TSEH: Third-Step Enzymatic Hydrolysate

$$*POV(\text{meq/kg}) = \frac{(a-b) \times f \times N}{S} \times 1000$$

(POV values are the means of triplicate experiments)

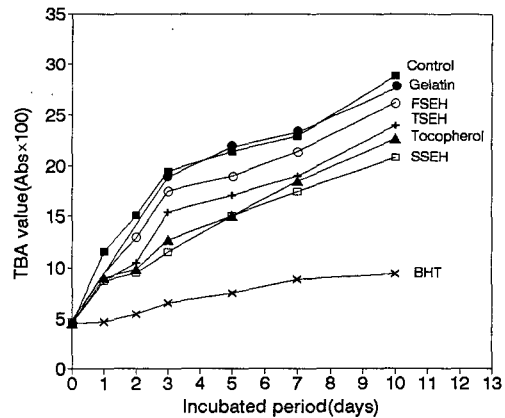


Fig. 2. Comparison of TBA value of gelatin hydrolysates with commercial antioxidants in the linoleic acid.

(TBA values are the means of triplicate experiments)

이와 같이 펩티드가 항산화력을 가지고 있다는 연구가 보고되고 있지만, 펩티드의 항산화 효과에 대한 정확한 작용 메카니즘을 밝혀져 있지 않고 다만 몇가지 설이 유력하게 제시되고 있다. Halliwell and Gutteridge (1990)는 항산화제의 작용은 산화적 충격에

대한 세포거대분자의 방어를 제공하며, 이는 항산화제의 활성산소종의 억제나 포착 또는 비라디칼이나 약산화물을 무해한 물질로 전환시키는 chain-blocking으로 작용하기 때문이라고 하였고, Chen and Nawar (1991)는 물의 존재하에서 유지에 대한 항산화 효과에 대해 기질과의 낮은 접촉빈도와 물과 아미노기와 수소결합에 의해 항산화력이 감소한다고 하였으며, Decker and Hultin (1990)은 carnosine의 항산화효과는 자유라디칼 소거제 및 수소이온 공여체로서 작용할 뿐만 아니라, 금속 킬레이트제로서 작용하기 때문이라고 보고하였다. 또한, Colbert and Decker (1991)는 펩티드의 지질산화 억제효과는 펩티드가 가지고 있는 산 또는 염기 group이 수소공여체로 작용하여 지질과산화물을 제거하기 때문이라고 보고하였다. 본 실험에서 분리한 펩티드의 항산화효과에 대한 메카니즘도 역시 확실히 밝힐 수는 없지만, 일반적으로 질소화합물의 특징인 수소이온 공여체로서의 작용과 자유라디칼을 포착하여 제거하는 라디칼 소거제로서 작용하기 때문일 것으로 판단된다.

한편, 항산화효과가 가장 높은 2단계 가수분해물의 첨가농도에 따른 항산화효과를 측정된 결과, 과산화물가의 측정에서는 펩티드의 농도가 유지증량에 대해 1.0% (w/w)까지는 항산화력이 증가하였으나, 그 이상 첨가시에는 오히려 항산화효과가 떨어지는 것으로 나타났다 (Fig. 3), TBA가의 경우도 경시적인 산화역

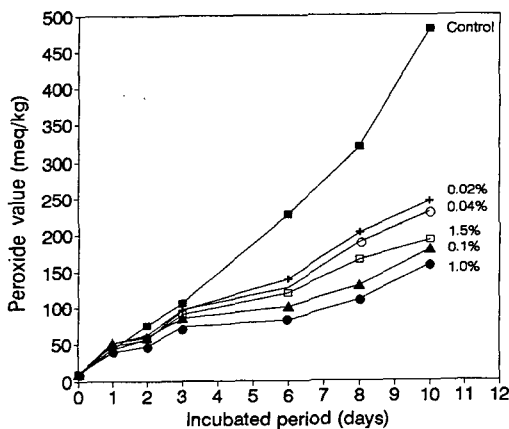


Fig. 3. Changes in peroxide value of the linoleic acid at various concentration of SSEH during the incubation. (POV values are the means of triplicate experiments)

제 효과를 조사한 결과, 과산화물가와 마찬가지로 1.0% (w/w)의 농도를 경계로 하여 그 이상 첨가하면 오히려 항산화성이 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 가수분해물의 첨가농도가 낮을 경우에는 가수분해물 자체의 산화정도가 항산화력에 크게 영향을 미치지 못하다가 1.0% (w/w) 이상의 가수분해물을 첨가했을 때 가수분해물의 산화정도가 항산화효과에 영향을 미치는 중요한 하나의 요소로서 작용하기 때문이 아닌가 생각된다. 따라서, 본 연구에서 분리한 2단계 가수분해물의 항산화 최적농도는 1.0% (w/w)임을 알 수 있었다.

각 단계별 젤라틴 가수분해물의 항산화능에 대한 상승효과를 검토하기 위해 천연항산화제인 α -tocopherol과 합성항산화제인 BHT와 각각 병용사용하여 항온기 내에서 10일간 저장한 후 과산화물가를 측정 한 결과, linoleic acid에서 α -tocopherol과 2단계 가수분해물을 동시에 사용한 경우 α -tocopherol만을 첨가한 대조구보다 28%의 높은 상승효과를 나타내었고, 1단계 및 3단계 가수분해물은 11%, 12%로 2단계 가수분해물에 비해 매우 낮은 상승효과를 나타내었다. 그러나 BHT와는 1~3% 정도 밖에 상승효과를 나타내지 못하였다 (Fig. 5). 이는 BHT나 가자미피 젤라틴 가수분해물이 단독적으로 항산화성이 강한 물질이기 때문에 유지의 산화자체가 거의 일어나지 않았기 때문으로 판단된다. Yamaguchi et al. (1975)은 대두단백

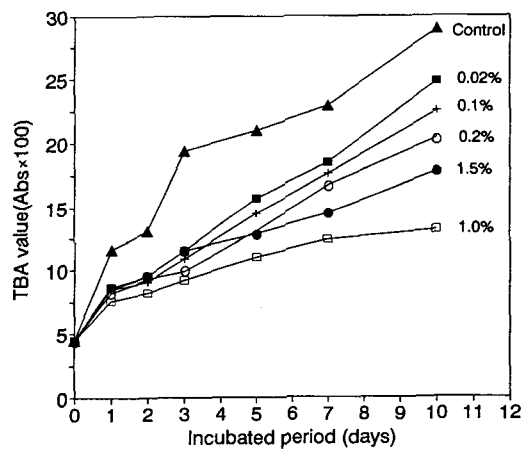


Fig. 4. Changes in TBA value of the linoleic acid at various concentration of SSEH during the incubation. (TBA values are the means of triplicate experiments)

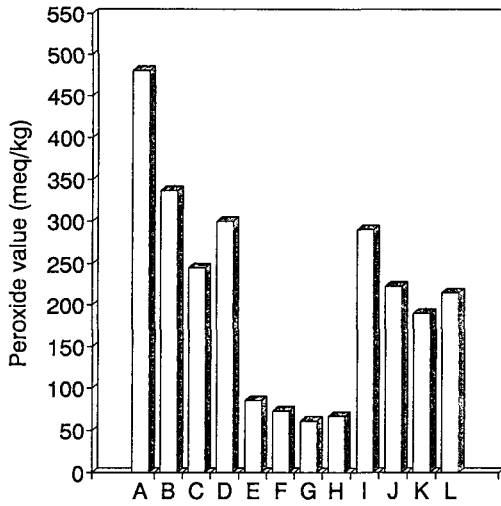


Fig. 5. Synergistic effects of enzymatic hydrolysates on antioxidants in the linoleic acid after incubated for 10 days.

A: control B: FSEH C: SSEH D: TSEH E: BHT
F: BHT+FSEH G: BHT+SSEH H: BHT+TSEH I: Toc J: Toc+FSEH K: Toc+SSEH L: Toc+TSEH

질, 우유카제인, 젤라틴, 난백알부민 등의 가수분해물과 α -tocopherol과의 상승성을 검토한 결과, 모든 가수분해물의 병용사용에서 높은 상승효과를 확인하였고 또한, Bishove and Henick (1975)은 식물성 단백질 가수분해물을 α -tocopherol과 함께 사용했을 경우 시료농도가 약 10% 정도일 때가 가장 높은 상승효과를 나타내었다고 보고한 바 있다. 따라서 가자미피 젤라틴 가수분해물은 0.02%의 낮은 농도에서도 뛰어난 상승효과를 나타내기 때문에 매우 우수한 상승제 (synergist)인 것으로 판단된다.

항산화성 펩티드의 분리·정제

각 단계별 가자미피 젤라틴 가수분해물 중 가장 항산화성이 우수한 2단계 가수분해물에서 가장 강한 항산화성을 나타내는 단일 펩티드 만을 분리하기 위해 겔여과, 이온교환크로마토그래피 및 ODS 역상 칼럼의 HPLC로부터 분획하여 과산화물가의 유도기간 (과산화물가가 100에 이르기까지의 일수)을 측정하였다. 먼저 Sephadex G-25 상에서 겔여과하여 각 분획별 항산화성을 측정한 결과, 획분 중에서 분자량 1,800~2,200 사이의 분획 I 부분에서 강한 항산화력을 나타

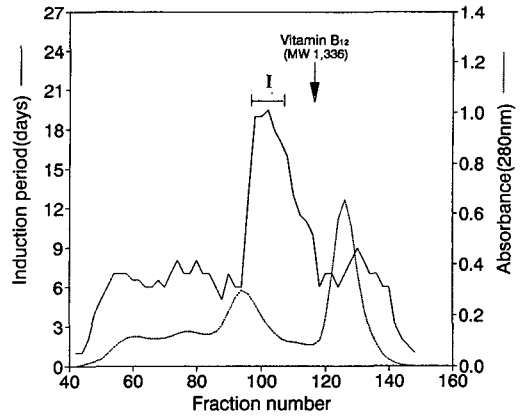


Fig. 6. Separation of SSEH by gel chromatography on a Sephadex G-25 column and antioxidative activities of fractions.

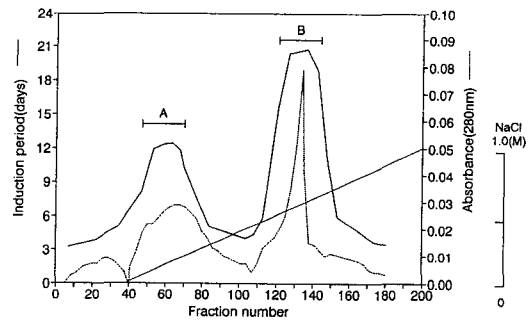


Fig. 7. Separation of the antioxidative peptides in fraction I by ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephadex A-25 column and antioxidative activities of fractions.

내었으며, 이 부분은 vitamin B₁₂(MW 1336)보다 약간 큰 분자량이었다 (Fig. 6). 다시 분획 I 부분 만을 DEAE-Sephadex A-25 칼럼 상에서 분획한 다음, 분획별 항산화성을 측정한 결과, A와 B 두 획분에서 강한 항산화성 펩티드를 얻을 수 있었으며 (Fig. 7), 두 획분 중 특히 항산화성이 우수한 B획분 만을 ODS 역상 칼럼 상에서 분석한 결과, B-1의 단일 획분을 얻었다 (Fig. 8).

단백질 가수분해물의 분자량과 항산화 효과와의 관계에 관한 연구로서, 山口 (1989)는 대두단백질의 효소적 가수분해물은 2,500~3,000 사이의 분자량에서 강한 항산화성을 나타내었다고 보고하였으며, Ka-

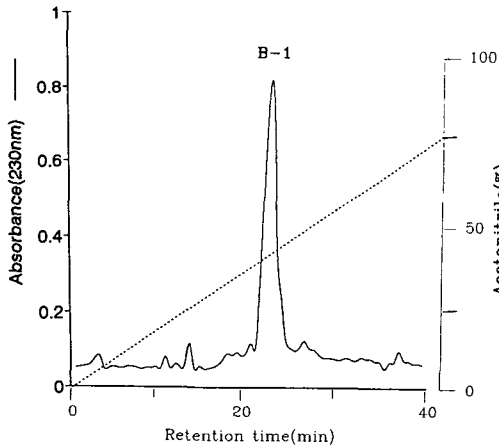


Fig. 8. HPLC pattern on ODS column for fraction B peptides obtained by DEAE-Sephadex A-25 column

washima et al.(1979)은 젤라틴 가수분해물에 대하여 항산화력을 측정하여 분자량 2,000 정도의 펩티드가 강한 효과를 나타내었다고 보고하였다. 한편, Yamaguchi et al.(1979)은 대두단백질, 우유 카제인 및 난백 알부민의 가수분해물에 대한 항산화력은 vitamin B₁₂ 보다 약간 큰 분자량을 가진 획분에서, 그리고 젤라틴 가수분해물은 그보다 약간 더 큰 분자량의 획분에서 가장 높았다고 하였다. 이러한 연구결과들을 볼 때, 단백질 가수분해물의 항산화 효과는 그 가수분해물의 분자량에 의존하는 것으로 생각되며, 가장 항산화력이 우수한 분자량 획분은 vitamin B₁₂보다 약간 큰 2,000 부근일 것으로 판단된다.

젤라틴 가수분해물의 세포분화에 미치는 영향

Hepatocyte 배양시 HPLC에서 분리한 항산화성 펩티드의 첨가구와 무첨가구 간의 TBHP의 농도에 따른 hepatocyte의 생존력에 대한 측정 결과, 항산화성 펩티드 첨가구가 무첨가구에 비해 TBHP의 독성에 대해 덜 민감한 반응을 나타내었다. 더우기, 두 대조구간의 dead cell 비율은 TBHP의 농도에 따라 점차적으로 증가하였는데, 항산화성 펩티드 첨가구의 경우는 TBHP가 250 μM에서부터 dead cell이 증가하는데 반해 무첨가구는 125 μM에서부터 급격한 증가율을 보임으로써 펩티드 첨가에 의해 세포의 과산화물에 대한 방어작용의 증가를 볼 수 있었다 (Fig. 9). 이런 펩티드 첨가에 따른 세포생존율의 연장은 세포내에 존

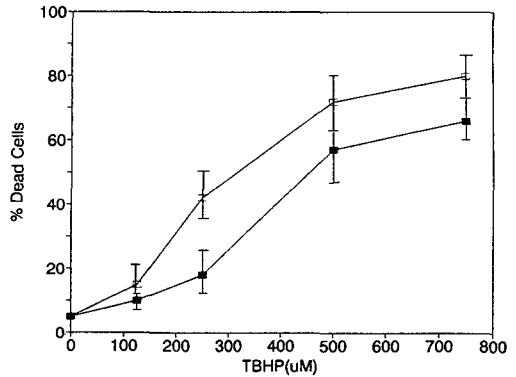


Fig. 9. Effect of TBHP concentration on cell killing of hepatocytes cultured overnight with (□) and without (■) 1 μM peptide. peptide: Isolated from the SSEH TBHP: *tert*-butyl hydroperoxide (The results are the means ± SD of the determinations on three separated cultures)

재하는 α-tocopherol의 항산화력을 상승시키거나, 보조하는 역할로서 펩티드가 작용하기 때문이라 판단되며, 이와 같은 과산화물에 대한 세포방어작용을 Fariss et al.(1984)은 hepatocyte cytoplasm에서 가장 풍부한 thiol형 비단백질의 환원형인 glutathion (GSH)의 감소가 세포충격을 유도하기 때문에 세포의 생존을 GSH의 감소 정도로 설명하였으며, Pascoe et al.(1987)은 항암제로 GSH을 소비하여 반응산소종 (reaction oxygen species)을 생성하는 adriamycin (ADR)과 GSH를 직접적으로 감소시키는 hepatocyte (ethacrynic acid로 처리)에서 α-tocopherol의 영향을 측정한 결과, 화학물질의 독성에 의해 산화-환원 반응이 일어나는 동안 단백질의 thiol기 감소가 세포내에 존재하는 α-tocopherol의 감소와 밀접한 관계가 있으므로 단백질의 thiol기 함량이 감소하면 세포의 방어기작도 그만큼 약화된다고 하였다.

Lipid peroxidation 측정에서는 TBA 반응생성물의 축적이 무첨가구에 비해 첨가구가 낮은 경향을 보였으며, 시간이 지날 수록 비슷한 경향으로 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 10). Pascoe and Reed (1987a)는 ·OH (hydroxyl radical)이나 LOO· (lipid radical)과 같은 반응산소종은 α-tocopherol과 같은 소수성막과 결합되어 있는 항산화제의 소비를 유도하여 세포의 방어효과를 감소시킨다고 보고하였고, Pascoe and Reed (1987b)

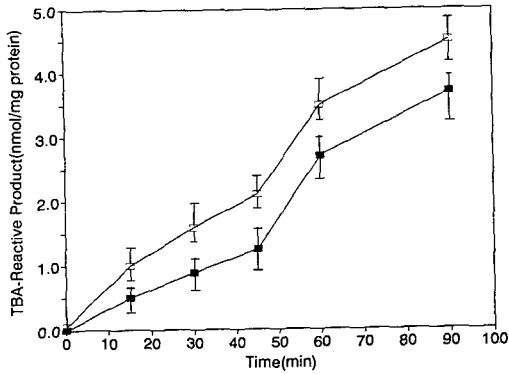


Fig. 10. Effect of 750 μM TBHP on the lipid peroxidation of hepatocytes incubated overnight with (■) and without (□) 1 μM peptide. Isolated from the SSEH TBHP: *tert*-butyl hydroperoxide (The results are the means ± SD of the determinations on three separated cultures)

는 항암제인 ADR의 사용에 의해 발생하는 심근경색 (cardiomyopathy)은 ADR이 산화-환원되는 동안 반응산소종의 생성과 GSH의 소비와 관련이 있다고 판단하여 이에 대한 vitamin E (α -tocopherol succinate)의 효과를 측정한 결과, 세포내 α -tocopherol의 함량이 증가하였으며, 0.6~1.0 nmol/cells의 농도에서 세포생존율이 가장 높게 나타나므로 vitamin E는 자유라디칼 소거제로서 작용한다고 추정하였다. Masaki et al. (1989)은 TBHP의 세포에 대한 독성에 대해 세포지질의 과산화에 의해 철 킬레이드제인 deferoxamine은 GSH의 소비를 억제함으로써 cell killing을 연장시켰으며, 항산화제인 N, N'-diphenyl-p-phenylene diamine (DPPD)이나 catechol은 glutathion의 대사과정이나 칼슘의 세포내 항상성에는 관계없이 t-butyl alkoxyl radical에 의해 생성되는 L· (lipid radical)을 포착하는 자체의 항산화성에 의해 세포충격을 방어한다고 하였다. Younes and Siegers (1984)도 지질과산화는 세포내의 α -tocopherol의 함량에 의존하지만 glutathion 농도와는 무관하며, 세포내부 항산화제는 GSH의 감소보다는 세포충격에 관계하는 산화에 중요한 역할을 한다는 Pascoe and Reed (1987)의 보고와는 다른 견해를 보였다. 또한 Liebler et al.(1986)은 hepatocyte내에서 α -tocopherol의 항산화효과에 있어서 ascorbic acid의 작용을 검토한 결과, ascorbic acid 단독으로 사용했을

시는 prooxidant로 작용하였으나 α -tocopherol과 병용 사용에 의해 α -tocopherol함량 감소를 억제하는 작용을 나타내었다고 하였다. 이러한 일련의 보고는 세포의 생존을 연장시키는데 직접적으로 관여하는 α -tocopherol의 함량을 유지시키기 위해 임의적으로 α -tocopherol을 투여하여 과산화물의 억제를 유도하였으나, 본 실험에서 추출한 펩티드는 그 자체의 항산화제로서 과산화물을 억제할 뿐 만 아니라 세포내에 존재하는 α -tocopherol의 항산화력을 증가시킴으로서 세포생존을 연장시킨다고 여겨지며, 이러한 의미에서 위 보고 중에 deferoxamine이나 DPPD의 첨가는 본 실험과 동일한 맥락으로 볼 수 있다.

요 약

연속식 3단계 막반응기로부터 각 단계별로 분리한 가자미피 젤라틴 가수분해물의 항산화성을 측정할 결과, 2단계 가수분해물의 항산화력이 가장 뛰어난 뿐만 아니라, 천연항산화제인 α -tocopherol보다 10% 정도의 높은 항산화력을 나타낸 반면, 1단계 및 3단계 가수분해물은 α -tocopherol보다 오히려 10~15% 정도 낮은 항산화력을 보였다. 가수분해물의 첨가한 농도에 따른 항산화성은 유지증량에 대해 1.0%(w/w)로 첨가한 농도에서 최대 항산화력을 나타내었다. 한편, 천연항산화제인 α -tocopherol과 합성항산화제인 BHT와의 상승효과를 검토한 결과, 각 단계별 가수분해물은 α -tocopherol과 우수한 상승효과를 관찰할 수 있었으며, 그 중 2단계 가수분해물의 상승효과가 가장 강하였다. 또한 항산화성이 가장 뛰어난 2단계 가수분해물로부터 gel column, ion exchange column 및 ODS column을 사용하여 항산화력이 특히 우수한 부분만을 분리한 단일 펩티드를 간세포에 첨가하여 세포생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과, TBHP의 독성에 대해 펩티드 첨가구가 무첨가구에 비해 세포생존을 연장시켰으며, lipid peroxidation 측정에서도 세포의 산화를 억제함으로써 세포의 생존율을 높였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업과제 (1993) 수행에 의한 연구결과이며, 연구비를 지원해 준 과학기술처에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of official analytical chemists, Washington D.C.
- Aoyama, M., T. Maruyama, I. Niiya and S. Akatsuka. 1985. Antioxidant effects of tocopherols on palm oil by frying tests. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish*, 34(11), 714~719 (in Japanese).
- Bishove, S. J. and A. S. Henick. 1972. Antioxidant effect of protein hydrolyzates in freeze-dried model systems. *J. Food Sci.*, 37, 873~875.
- Bishove, S. J. and A. S. Henick. 1975. Antioxidant effect of protein hydrolyzates in freeze-dried model systems. Synergistic action with a series of phenolic antioxidants. *J. Food Sci.*, 40, 345~348.
- Chen, Z. Y. and W. W. Nawar. 1991. The role of amino acids in the autoxidation of milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(1), 47~50.
- Colbert, L. B. and E. A. Decker. 1991. Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *J. Food Sci.*, 56(5), 1248~1250.
- Decker, E. A. and H. O. Hultin. 1990. Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle. *J. Food Sci.*, 55 (44), 947~953.
- Fariss, M. W., K. Olafsdottir and D. J. Reed. 1984. Extracellular calcium protects isolated rat hepatocytes from injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121(1), 102~110.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1990. The antioxidant of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280(1), 1~8.
- Hayes, R. E., G. N. Bookwalter and E. B. Bagley. 1977. Antioxidant activity of soybean flour and derivatives. *J. of Food Sci.*, 42(6), 1527~1532.
- Kawashima, K., H. Itoh and I. Chibata. 1979. *Agric. Biol. Chem.* 43, 827~832.
- Kim, S. K., Y. J. Jeon, H. G. Byen, C. B. Ahn, D. J. Jou and E. H. Lee. 1995. Development of natural seasoning from fish skin using continuous three-step membrane reactor. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 10(5), 510~517 (in Korean).
- Kohen, R., Y. Yamamoto, K. C. Cundy and B. N. Ames. 1988. Antioxidant activity ofarnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(9), 3175~3179.
- Lee, G. D., J. S. Kim, J. O. Bae and H. S. Yoon. 1992. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in Wormwood. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 21(1), 17~19 (in Korean).
- Liebler, D. C., D. S. Kling and D. J. Reed. 1986. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α -tocopherol. *J. Biol. Chem.*, 261(26), 12114~12119.
- Maeng, Y. S. and h. K. Park. 1991. Antioxidant activity of ethanol extract from Dodok (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23 (3), 311~316 (in Korean).
- Masaki, N., M. E. Kyle and J. L. Farber. 1989. tert-Butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 269(2), 390~399.
- Oh, M. J., K. S. Lee, H. Y. Son and S. Y. Kim. 1990. Antioxidative components of Pueraria root. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(7), 793~798 (in Korean).
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351~358.
- Pascoe, G. A., K. Olafsdottir and D. J. Reed. 1987. Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. I. Maintenance of cellular protein thiols as a cytoprotective mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 256(1), 150~159.

- Pascoe, G. A. and D. J. Reed. 1987a. Relationship between cellular calcium and vitamin E metabolism during protection against cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, 253(2), 287~296.
- Pascoe, G. A. and D. J. Reed. 1987b. Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, 256(1), 159~166.
- Rhee, K. S., Y. A. Ziprin and K. C. Rhee. 1979. Water-soluble antioxidant activity of oilseed protein derivatives in model lipid peroxidation systems of meat. *J. of Food Sci.*, 44, 1132~1135.
- Suetsuna, K. and K. Osajima. 1989. Blood pressure reductim and vasolilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 42(1), 47~54.
- Turner, F. W., W. D. Paynter, E. J. Montie, M. W. Bessert, G. M. Struck and F. C. Olson. 1954. Use of the 2-thiobarbituric acid reagent to measure rancidity in frozen pork. *Food Technol.*, 8, 326~331.
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1975. Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish*, 22(9), 425~431 (in Japanese).
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and M. Fujimaki. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuin Kogyo Gakkaish*, 26(2), 65~70 (in Japanese).
- Yoshikawa, M. 1988. Biologically functional peptides derived from food proteins. *Food processing*, 23(4), 39~43 (in Japanese).
- Younes, M. and C. P. Siegers. 1984. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. *Biochem. Pharmacol.*, 33(13), 2001~2003.
- 本井博文. 1989. 小麦グルテンからの食品素材の製造. *月刊フドケミカル*, 5(5), 46~52.
- 山口直彦. 1989. ペプチド의 抗酸化性. *New Food Industry*, 31(8), 18~22.
- 西橋香治. 1991. ひまわり抽出物の抗酸化劑利用. *New Food Industry*, 33(6), 17~23.
- 大澤俊彦, 並木滿夫. 1982. 脂質의 過酸化와 變異原性. *變異原と性*, 5(3), 243~252.

1995년 12월 19일 접수

1996년 2월 24일 수리